

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



10/516818

(43) 国際公開日
2003 年 12 月 18 日 (18.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/103740 A1

- | | | |
|--|---|--|
| (51) 国際特許分類: | A61L 27/46, 27/54 | (TANAKA, Junzo) [JP/JP]; 〒305-0044 茨城県 つくば市 並木1-1 独立行政法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP). |
| (21) 国際出願番号: | PCT/JP03/05611 | 田口 哲志 (TAGUCHI, Tetsushi) [JP/JP]; 〒305-0044 茨城県 つくば市 並木1-1 独立行政法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP). |
| (22) 国際出願日: | 2003 年 5 月 2 日 (02.05.2003) | |
| (25) 国際出願の言語: | 日本語 | (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都 港区 虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5 森ビル 3階 Tokyo (JP). |
| (26) 国際公開の言語: | 日本語 | |
| (30) 優先権データ: | 特願2002-168588 2002 年 6 月 10 日 (10.06.2002) JP | (81) 指定国 (国内): CA, US. |
| (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP). 独立行政法人物質・材料研究機構 (NATIONAL INSTITUTE FOR MATERIALS SCIENCE) [JP/JP]; 〒305-0047 茨城県 つくば市 千現一丁目 2 番 1 号 Ibaraki (JP). | | (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR). |
| (72) 発明者; および | | 添付公開書類: |
| (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田中 順三 | | — 国際調査報告書 |
| | | 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。 |

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/103740 A1

(54) Title: SCAFFOLD MATERIAL FOR REGENERATION OF HARD TISSUE/SOFT TISSUE INTERFACE

(54) 発明の名称: 硬組織-軟組織界面再生用足場材料

(57) Abstract: A scaffold material capable of effective regeneration of hard tissue/soft tissue interface, comprising a biodegradable polymeric material wherein calcium phosphate is contained with an inclination; and an implant for hard tissue/soft tissue supplement, using the scaffold material.

(57) 要約: 本発明は、硬組織と軟組織の界面を効果的に再生しうる、リン酸カルシウムが傾斜化して含有された生分解性高分子材料からなる足場材料と、該足場材料を利用した硬組織-軟組織補填用インプラントに関する。

明 細 書

硬組織－軟組織界面再生用足場材料

5 技 術 分 野

本発明は硬組織－軟組織界面再生用足場材料に関する。より詳細には、硬組織（骨と歯）と軟組織（骨と歯以外の組織）の界面を効果的に再生しうる、リン酸カルシウムが傾斜化して含有される生分解性高分子材料からなる足場材料と、該足場材料を利用した硬組織－軟組織補填用インプラントに関する。

背 景 技 術

軟骨は再生能力の限られた軟組織であるため、事故や疾患等で破損・欠失した軟骨を自然再生させることは困難である。そのため、従来、軟骨欠損部の治療では、モザイクプラスティと呼ばれる荷重のかからない部位の軟骨組織を採取して患部に再移植する手法が中心であった。しかし、自家組織の使用は患者への負担が大きく、その採取量にも限界があるため、これに代る手段として、他人の軟骨組織を用いた同種移植（allograft）も試みられたが、拒絶反応や感染の問題から十分な結果は得られていない。

一方、最近生体から取り出した自己の細胞を *in vitro* で培養・組織化し、限りなく生体に近い組織を再構築して生体に戻す、再生医学の研究が進められている。この方法で再生された組織は自己に由来するため、拒絶反応や感染の問題は伴わず、組織欠損部の理想的な治療手段として注目される。特に、軟骨組織については、前述のような理由から、多くの研究機関によってその *in vitro* での再生が試みられている。

ところで、細胞は生体内で細胞外マトリックスに接着して存在し、これを足場として分化・増殖を行う。したがって、*in vitro* での細胞培養による完全な三次元組織構築のためには、細胞の分化・増殖のための適切な足場の提供が必要となる。これまで、硬組織の再生においては、コラーゲン
5 ゲルやアガロースゲル等を足場として用いることで、良好な組織再生結果が得られている。

しかしながら、再生された軟骨組織を生体内に移植しても、今度は移植部位の骨組織と再生された軟骨組織との接着が弱いために、軟骨欠損部を十分に補うことができないという新たな問題が生じる。

10 これに対し、Schaefer らは、ポリグリコール酸からなる生分解性足場材料を用いて軟骨様組織を、また（乳酸・グリコール酸共重合体とポリエチレングリコール）からなる足場材料を用いて骨様組織をそれぞれ別個に形成し、その後両者を人為的に接着して硬組織－軟組織界面様組織を作製する方法を報告している（Schaefer et al., *Biomaterials* 21 (2000)
15 p2599-2606）。しかし、この方法で作製される硬組織－軟組織界面様組織（骨－軟骨界面様組織）は、硬組織（骨）－軟組織（軟骨）の結合が十分ではないという問題がある。

一方、Yaylaoglu らは、凍結乾燥コラーゲンスポンジ（Gelfix™ メンブレン、Abdi-Ibrahim 製）中にリン酸カルシウムを形成させ、これを足場と
20 して軟骨細胞を培養して、骨軟骨インプラントを作製する方法を報告している（Yaylaglu et al., *Biomaterials* 20 (1999) p1513-1520）。しかし、リン酸カルシウムを単に含有させただけの材料では、硬組織（骨）との接着が不十分で、硬組織－軟組織界面（この場合は、骨－軟骨界面）を効果的に再生することはできない。

発 明 の 開 示

本発明は、硬組織と軟組織の界面を効果的に再生する足場材料を提供し、これを利用することにより硬組織－軟組織欠損部を十分に補填できるインプラントを提供することを目的とする。

- 5 上記課題を解決するために本発明者らは鋭意検討した結果、硬組織の接触面にこれらの構造に類似したアパタイト構造を形成させれば、硬組織との接着が向上すると考えた。そして、交互浸漬法を利用して生分解性高分子材料中にリン酸カルシウムを傾斜化して形成させることにより、硬組織との接着がよく、かつ軟組織再生機能にも優れた、足場材料が得られることを見出し本発明を完成させた。

すなわち、本発明は以下の（１）～（８）を提供する。

- （１） 生分解性高分子材料内にリン酸カルシウムが傾斜化して含有されていることを特徴とする複合材料。
- （２） 生分解性高分子材料がグリコサミノグリカン、コラーゲン、およびこれらの複合体から選ばれる一種または二種以上である、上記（１）記載の複合材料。
- 15 （３） 生分解性高分子材料が、グリコサミノグリカンとコラーゲンの架橋体である、上記（１）記載の複合材料。
- （４） 上記（１）～（３）記載の複合材料からなる、細胞の分化・増殖のための足場材料。
- 20 （５） 硬組織と軟組織の界面を効果的に再生できることを特徴とする、上記（４）記載の足場材料
- （６） 上記（１）～（３）記載の複合材料を含む、硬組織－軟組織補填用インプラント。
- 25 （７） 前記インプラント内にさらに細胞を含む、上記（６）記載のイン

プラント。

(8) 生分解性高分子材料の片面または一部分を、カルシウムイオン含有溶液とリン酸イオン含有溶液に交互に浸漬することにより、該生分解性高分子材料中にリン酸カルシウムが傾斜化して含有された複合材料を製造

5 する方法。

以下、本発明について詳細に説明する。

1. リン酸カルシウムが傾斜化された複合材料

本発明は、生分解性高分子材料内にリン酸カルシウムが傾斜化して含有
10 されていることを特徴とする複合材料に関する。

1. 1 生分解性高分子材料

本発明の複合材料を構成する生分解性高分子材料は、生体内で分解・吸収される高分子材料で、例えば、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コン
15 ドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、およびケラタン硫酸等のグリコサミノグリカンやその化学修飾物、コラーゲン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリエチレングリコール、およびこれらの共重合体や架橋物、あるいはこれらの二種以上からなる複合体等を挙げることができる。

20 特に、本発明においては、軟骨マトリックス等の軟組織構成成分である、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、ヘパリン、およびヘパラン硫酸等のグリコサミノグリカン、コラーゲン、あるいはこれらの二種以上からなる複合体を生分解性高分子材料として用いることが好ましい。
なお、前記複合体は、二種以上の生分解性高分子材料を単に混合して乾燥・
25 成形するなどして複合化してもよいが、各生分解性高分子材料間に適当な

架橋を導入して複合化すると、生分解性高分子材料の強度や生体内での吸収速度が向上するため好ましい。例えば、本発明で用いられる生分解性高分子材料の好適な 1 例として、ヒアルロン酸と II 型コラーゲンからなる複合体を挙げることができる。

- 5 前記ヒアルロン酸の由来は、特に限定されず、鶏冠や臍帯等から抽出されたものでも、微生物によって産生されたものであってもよい。また、ヒアルロン酸の分子量も特に限定されないが、10～100万程度のものが好ましい。

- 本発明の生分解性高分子材料に用いられるコラーゲンの由来は特に限定
10 されず、哺乳動物（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ネズミ等）、鳥類（例えば、ニワトリ等）、魚類等の組織から得られるコラーゲンを用いてもよいし、遺伝子組み替え技術によって得られるコラーゲンを用いてもよい。

- コラーゲンには現在 19 の異なる種類が知られており、そのいずれのコラーゲンを用いてもよいが、特に骨－軟骨界面再生を目的とする場合であれば、軟骨マトリックスの主成分である II 型コラーゲンが好ましい。
15

- なお、天然のコラーゲンの大部分は不溶性であるが、これをアルカリ処理あるいは酵素処理によって可溶化した可溶化コラーゲンを用いると、取り扱いやすく、しかも抗原性を有する部分が除去されているため好ましい。また、フタル化コラーゲンはどのような pH のバッファーにでも溶解し、扱いやすいという点で好ましい。
20

1. 2 リン酸カルシウム

- 本発明の複合材料を構成する、リン酸カルシウムは、 CaHPO_4 、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 、 $\text{CaP}_4\text{O}_{11}$ 、 $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$ 、 $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 、 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ などの化学式で示される 1 群の化合物である。これらのリン酸カルシウムは
25

水溶液中に浸漬しておくで複合体中で熱力学的に安定なハイドロキシアパタイト（水酸アパタイト）に変化する。

ハイドロキシアパタイトは、一般組成を $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ 、とする化合物であり、コラーゲンとともに哺乳類の硬組織（骨や歯）の主要構成成分ある。

- 5 ハイドロキシアパタイトは、前述した一連のリン酸カルシウムを含むが、生体硬組織中のアパタイトの PO_4 および OH 成分は大気中の CO_2 と置換していることが多い。本発明の複合材料においてもかかる置換がある程度（0～10 質量％程度）含まれていてもよい。なお、ハイドロキシアパタイトは、

10 1. 3 リン酸カルシウムの傾斜化

本発明の複合材料において、リン酸カルシウムは生分解性高分子材料内に傾斜化して含有される。ここで、「傾斜化」とは、一定の勾配で変化することを意味する。すなわち、リン酸カルシウムは、生分解性高分子材料の一方の側から他方の側に向けて、一定の勾配で密から疎へと変化して含有

15 されている。

2. リン酸カルシウムが傾斜化された複合材料の作製方法

2. 1 生分解性高分子材料の作製

- 本発明の複合材料に用いられる生分解性高分子材料の好適な例として、
- 20 ヒアルロン酸と II 型コラーゲンからなる架橋体の作製方法について説明する。

適当な量のコラーゲンに、コラーゲンの 0. 1～5 0 % のヒアルロン酸を 0. 0 1～0. 5 M のリン酸緩衝液等の生理的緩衝液に溶解させて加える。次いで、ここに架橋剤（あるいは縮合剤）を添加して化学的架橋を導入する。用いる架橋剤としては、例えば、グルタルアルデヒド、ホルム

25

アルデヒド等のアルデヒド系架橋剤；ヘキサメチレンジイソシアネート等のイソシアネート系架橋剤；1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩等のカルボジイミド系架橋剤；エチレングリコールジエチルエーテル等のポリエポキシ系架橋剤；トランスグルタミナーゼ等が挙げられるが、本発明においては4官能性架橋剤である、PTE-10TGS (pentaerythritol polyethyleneglycol ether tetrasuccinimidyl glutarate) が好適である。用いる架橋剤の濃度は、架橋対象物の組成や量に合わせて適宜設定されるが、PTE-10TGS の場合であれば反応液中の最終濃度が0.1 mM~10 mM程度になるように加えることが好ましい。

10 なお、架橋は前記のような化学的架橋のほか、 γ 線、紫外線、熱脱水、電子線等を用いた物理的架橋法で導入してもよい。

また、架橋はコラーゲンおよびヒアルロン酸のどの官能基を架橋するものであってもよく、コラーゲンとヒアルロン酸との間のみならず、コラーゲン分子間、ヒアルロン酸分子間のにも導入される。特に、これらの分子
15 内の水酸基と ϵ -アミノ基、 ϵ -アミノ基同士を架橋することが好ましい。

2. 2 リン酸カルシウムの傾斜化（水酸アパタイトの形成）

生分解性高分子材料内へのリン酸カルシウムの傾斜化は、例えば、交互浸漬法を利用して、生分解性高分子材料の特定の面をリン酸イオン含有溶液とカルシウムイオン含有溶液に交互に浸漬することにより行うことができる。

用いられるリン酸イオン含有溶液のリン酸源としては、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸二水素カリウムおよびリン酸等が挙げられる。該リン酸イオン含有溶液の濃度
25 は、0.1~500 mMが好ましい。

また、用いられるカルシウムイオン含有溶液のカルシウム源としては、例えば塩化カルシウム、炭酸カルシウム、酢酸カルシウム、水酸化カルシウム等が挙げられる。該カルシウムイオン含有溶液の濃度は、0.1～800 mMが好ましい。なお、カルシウムイオン含有溶液は均一な状態であれば懸濁液であってもよい。

本発明においては、生分解性高分子材料内にリン酸カルシウムを傾斜化させるために、生分解性高分子材料の一方の面のみを、リン酸イオン含有溶液またはカルシウムイオン含有溶液に浸漬する。浸漬は1つの溶液に対し10秒～120分間、少なくとも1サイクル以上繰り返すことが好ましい。こうして生分解性高分子材料内に傾斜化して含有されたリン酸カルシウムの大部分はアパタイト構造を形成する。

2. 3 リン酸カルシウムの傾斜化の確認

前項の方法によって作成された複合材料中におけるリン酸カルシウムの分布は、X線回折、顕微鏡観察、赤外吸収スペクトル、および元素分析等の各種分析を単独あるいは組み合わせることにより確認することができる。

3. 硬組織－軟組織界面再生用足場材料、硬組織－軟組織補填用インプラント

3. 1 硬組織－軟組織界面再生用足場材料

本発明にかかる複合材料は生分解性高分子材料をマトリックスとするため、細胞培養の好適な足場として、生体外および生体内における軟組織の構築を可能にする。

また、該生分解性高分子材料内にはリン酸カルシウムが傾斜化して含有され、形成されるリン酸カルシウムの結晶性が低いために生体親和性が高

い。それゆえ、本発明の複合材料は、従来の足場材料とは異なり、ハイドロキシアパタイトを高密度で含む部分において硬組織（骨や歯）に高い親和性を有し、硬組織－軟組織界面を再生することができる。

すなわち、本発明の複合材料は、硬組織－軟組織界面再生用足場材料として好適に用いることができる。なお、本発明において、「硬組織」とは、骨、歯といった硬い細胞間物質を持つ組織を意味し、「軟組織」とは、硬組織以外の組織（例えば、軟骨等）を意味する。

3. 2 硬組織－軟組織補填用インプラント

さらに、本発明の複合材料に、細胞を播種して（生体外で培養後、あるいは培養せず直接に、）硬組織－軟組織欠損部に移植すれば、これは硬組織－軟組織欠損部を補填する好適なインプラントとなりうる。すなわち、移植された複合材料を足場として、播種した細胞による組織再生が進む一方、複合材料自体は徐々に吸収され、最終的に再生された軟組織に置換する。

特に、骨－軟骨界面再生を目的とする場合であれば、上記細胞としては、軟骨細胞、骨芽細胞、間葉系幹細胞、ES細胞等を好適に用いることができる。また、生分解性高分子材料としては、ヒアルロン酸やコラーゲン等の生体軟骨マトリックス構成成分を用いることができ、これは前述した細胞の分化・増殖のための好適な足場となりうる。

3. 3 その他

本発明の足場材料および硬組織－軟組織補填用インプラントの形態及び形状は、特に限定されず、スポンジ、メッシュ、不織布状成形物、ディスク状、フィルム状、棒状、粒子状、及びペースト状等、任意の形態及び形状を用いることができる。こうした形態や形状は、足場材料やインプラン

トの使用目的に応じて適宜選択すればよい。

本発明の足場材料および硬組織－軟組織補填用インプラントは、その目的と効果を損なわない範囲において、適宜他の成分を含んでいてもよい。そのような成分としては、例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、血小板分化増殖因子 (PDGF)、インスリン、インスリン様増殖因子 (IGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、グリア誘導神経栄養因子 (GDNF)、神経栄養因子 (NF)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF)、および血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 等の増殖因子、骨形成タンパク質 (BMP) や転写因子等のその他のサイトカイン、ホルモン、Si、Mg、Ca 及び CO_3 等の無機塩、クエン酸及びリン脂質等の有機物、抗がん剤等の薬剤等を挙げることができる。

本発明の複合材料は、硬組織に高い親和性を有するため、理想的な硬組織－軟組織界面再生用足場材料または硬組織－軟組織補填用インプラントとなりうる。

15 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の足場材料作製のための装置を示す。

図 2 は、作製された足場材料を実体顕微鏡で観察した断面を示す写真である

図 3 は、作製された足場材料の断面を元素分析した結果を示す。

20 図 4 は、作製された足場材料の X 線回折結果を示すグラフである (A : Col/HyA0、B : Col/HyA2、C : Col/HyA10)。

図 5 は、作製された足場材料の赤外吸収スペクトルを示すグラフである。

図 6 は、示差熱量分析による無機成分による無機成分定量結果を示すグラフである。

25 図 7 は、電子顕微鏡による表面観察結果を示す画像である。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願 2 0 0 2 - 1 6 8 5 8 8 号の明細書に記載された内容を包含する。

5 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1〕 リン酸カルシウムが傾斜化された複合材料の作製

1. 試験方法

10 1. 1 軟骨マトリックスの作製

軟骨の主成分である II 型コラーゲン (Col)、ヒアルロン酸 (Hya)、コンドロイチン硫酸 (ChS) のうちの II 型コラーゲン (II 型コラーゲン (ウシ由来): 新田ゼラチン社製、)、ヒアルロン酸 (ヒアルロン酸 (分子量 64 万): 生化学工業 (株) 製) を用いて実験を行った。

15 調製した軟骨マトリックスは以下の通りである。

1) コラーゲン (Col/Hya0): コラーゲンの最終濃度が 1 %

2) コラーゲン+2wt%のヒアルロン酸 (Col/HyA2): 2wt%ヒアルロン酸含有コラーゲンの最終濃度が 1 %

3) ラーゲン+10wt%のヒアルロン酸 (Col/HyA10): 10wt%ヒアルロン酸含有

20 コラーゲンの最終濃度が 1 %

架橋剤は、PTE - 10TGS (pentaerythritol polyethyleneglycol ether tetrasuccinimidyl glutarate) を使用し、最終濃度が 0.3mM または 1.0mM になるように加えた。溶媒は pH7.4 の 0.1M Phosphate Buffer Solution (PBS) を用いた。

1. 2 水酸アパタイトの形成（交互浸漬法）

調製した軟骨マトリックスを図 1 のようにドーナツ状のゴムに挟み、シリンジの中に挿入した。片側には反応させる溶液を、もう片側には超純水を用いた。

5 反応溶液には $\text{CaCl}_2/\text{Tris-HCl}$ および Na_2HPO_4 を用いた。

まず、反応溶液側に $\text{CaCl}_2/\text{Tris-HCl}$ 溶液（pH7.4）を入れ、37℃で5分間放置した。その後、超純水で洗浄し、反応溶液を Na_2HPO_4 に変え、同様に37℃、5分間放置した。この工程を1サイクルとし、30サイクルまで行った。

10

1. 3 各サンプルの分析

各サイクルのサンプルについて X 線回析、赤外吸収スペクトル（FT-IR）による物質の同定、電子顕微鏡（SEM）観察および元素分析を行った。無機成分量は、示差熱量分析により定量した。

15

2. 試験結果

2. 1 実体顕微鏡による観察

サイクル数が増加するにつれ、軟骨マトリックスに白い結晶が析出した。実体顕微鏡（VH-7000C：KEYENCE 社製、倍率：×35）によって軟骨マトリックス断面を観察するとマトリックスの片側（反応面）から内部に向かって傾斜的に結晶が形成していることが確認された（図 2）。

20

2. 2 断面の元素分析

交互浸漬した軟骨マトリックスを凍結乾燥し、断面の元素分析を行った。
Ca と P は反応面（top 側）に多く分布し、マトリックスの内部に向かうほ

25

ど減少しており、マトリックスに結晶が傾斜化して形成されていることが確認された（図3）。

2. 3 X線回折

5 各サイクル反応を行った後のX線回折をPHILIPS社製PW1729を用いて測定し、形成した白色の結晶の同定を行った（図4）。30°付近にhydroxyapatite (HAp)の強いピークが観察され、4°付近にはoctacalcium phosphate (OCP)の最強線が確認された。ピークの強度はサイクル数の増加に伴い増加した。軟骨マトリックス間での白色結晶の差異は認められなかつた。

2. 4 赤外吸収スペクトル (FT-IR) によるリン酸カルシウムの同定

FT-IRは、PERKIN ELMER社製SPECTRUM 2000を用いて拡散反射法により測定した。用いたゲルは各々のサンプルにおいて30サイクルのものを交互浸漬されている部分（リン酸カルシウムが形成した部分）だけを削り取り、それを凍結乾燥した後にFT-IRによって同定した（図5）。

Col/HyA0での条件において、 COO^- :1744.39 cm^{-1} 、amideIII:1228.80 cm^{-1} 、amideII:1539.99 cm^{-1} 、amideI:1653.45 cm^{-1} 、 COO^- :1378.23 cm^{-1} 。HApのOH:3437.50 cm^{-1} 、1447.75 cm^{-1} 、 CO_3^{2-} :1456.82 cm^{-1} 、 PO_4^{3-} :1033 cm^{-1} 、600.51 cm^{-1} 、561.92 cm^{-1} の振動が見られた。

Col/HyA2での条件において、amideIII:1232.59 cm^{-1} 、amideII:1540.23 cm^{-1} 、amideI:1651.88 cm^{-1} 、 COO^- :1379.07 cm^{-1} 。HApのOH:3304.81 cm^{-1} 、 CO_3^{2-} :1456.09 cm^{-1} 、1443.09 cm^{-1} 、 PO_4^{3-} :1038 cm^{-1} 、600.90 cm^{-1} 、562.89 cm^{-1} の振動が見られた。

25 Col/HyA10での条件において、amideIII:1231.94 cm^{-1} 、

amideII:1530.04 cm^{-1} 、amideI:1662.34 cm^{-1} 、COO⁻:1379.47 cm^{-1} 。HAp の OH:3306.22 cm^{-1} 、CO₃²⁻:1456.39 cm^{-1} 、1443.62 cm^{-1} 、PO₄³⁻:1038 cm^{-1} 、600.88 cm^{-1} 、563.04 cm^{-1} の振動が見られた。

5 2.5 示差熱量分析による無機成分の定量

凍結乾燥した軟骨マトリックスを TRigaku 社製 hermo plus TG 8120 を用いて示差熱量分析を行い、有機成分を除去し、残存する無機成分含有量(%)を算出した(図6)。無機成分含有量は、サイクル数が増加するに従い増加した。ヒアルロン酸の濃度依存性は、認められなかった。用いた架橋剤の濃度範囲では、無機成分含量に差異は認められなかった。

2.6 電子顕微鏡観察

走査型電子顕微鏡(JSM-5600LV:JEOL 社製、倍率:×10000(反応面)、×200(未反応面))により反応面(top)と未反応面(bottom)の表面観察を行った(図7)。反応面にはリン片状の物質が確認された。未反応面では細胞が入るのに十分な大きさ(50~200 μm)の細孔を持ったスポンジ状のポアサイズを持っていた。

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

本発明によれば、リン酸カルシウムが傾斜化して含有される生分解性高分子材料が提供される。該生分解性高分子材料は、硬組織との接着が良く、しかも軟組織の細胞の分化・増殖のための優れた足場となりうる。すなわ

ち、該生分解性高分子材料は硬組織－軟組織界面再生用足場材料または硬組織－軟組織補填用インプラントとして利用しうる。

請 求 の 範 囲

1. 生分解性高分子材料内にリン酸カルシウムが傾斜化して含有されていることを特徴とする複合材料。
- 5 2. 生分解性高分子材料がグリコサミノグリカン、コラーゲン、およびこれらの複合体から選ばれる一種または二種以上である、請求の範囲第1項に記載の複合材料。
3. 生分解性高分子材料が、グリコサミノグリカンとコラーゲンの架橋体である、請求の範囲第1項に記載の複合材料。
- 10 4. 請求の範囲第1項～第3項に記載の複合材料からなる、細胞の分化・増殖のための足場材料。
5. 硬組織と軟組織の界面を効果的に再生できることを特徴とする、請求の範囲第4項に記載の足場材料。
6. 請求の範囲第1項～第3項に記載の複合材料を含む、硬組織－軟組織補填用インプラント。
- 15 7. 前記インプラント内にさらに細胞を含む、請求の範囲第6項記載のインプラント。
8. 生分解性高分子材料の片面または一部分を、カルシウムイオン含有溶液とリン酸イオン含有溶液に交互に浸漬することにより、該生分解性高分子材料中にリン酸カルシウムが傾斜化して含有された複合材料を製造する方法。
- 20

図 1

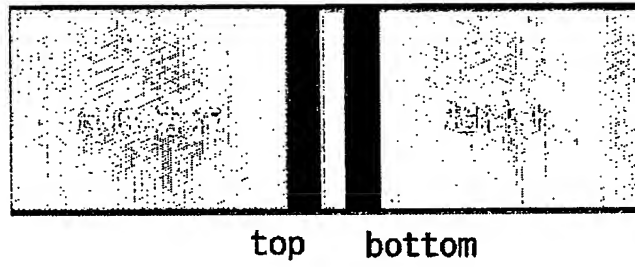
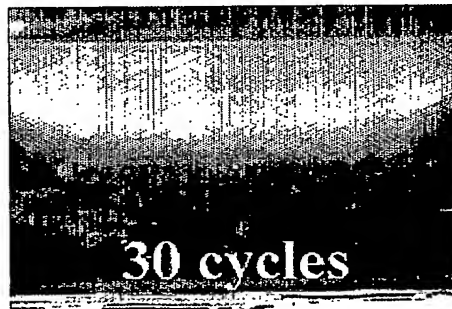
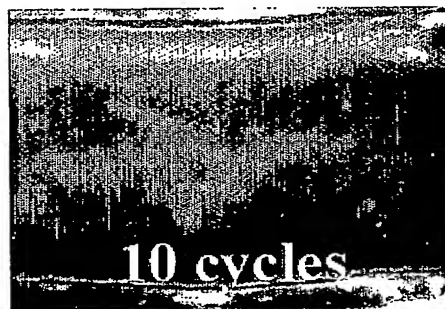
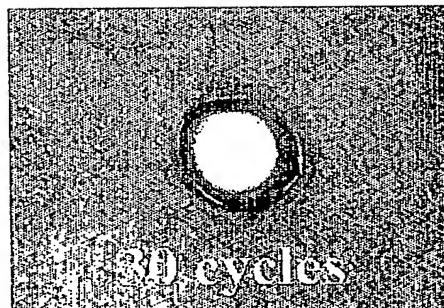
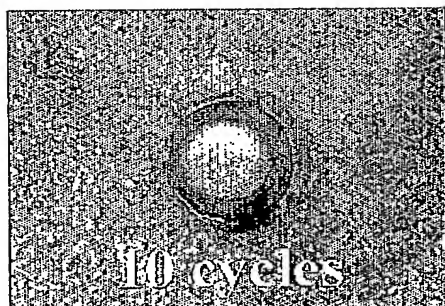
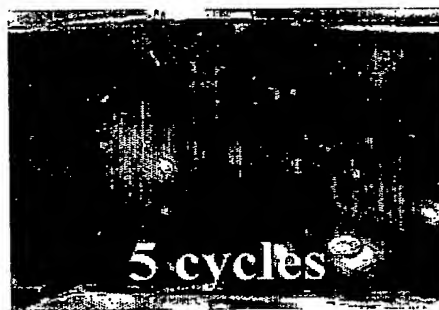
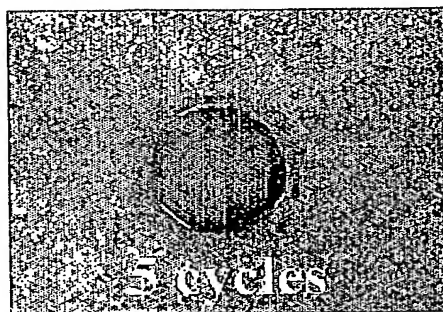
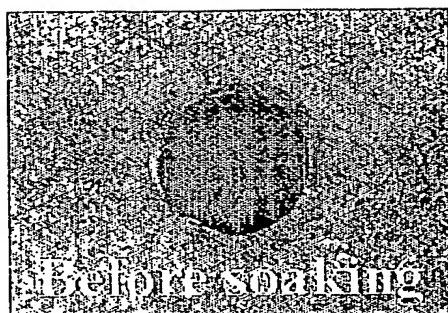


図 2



3

(断面の元素分析)

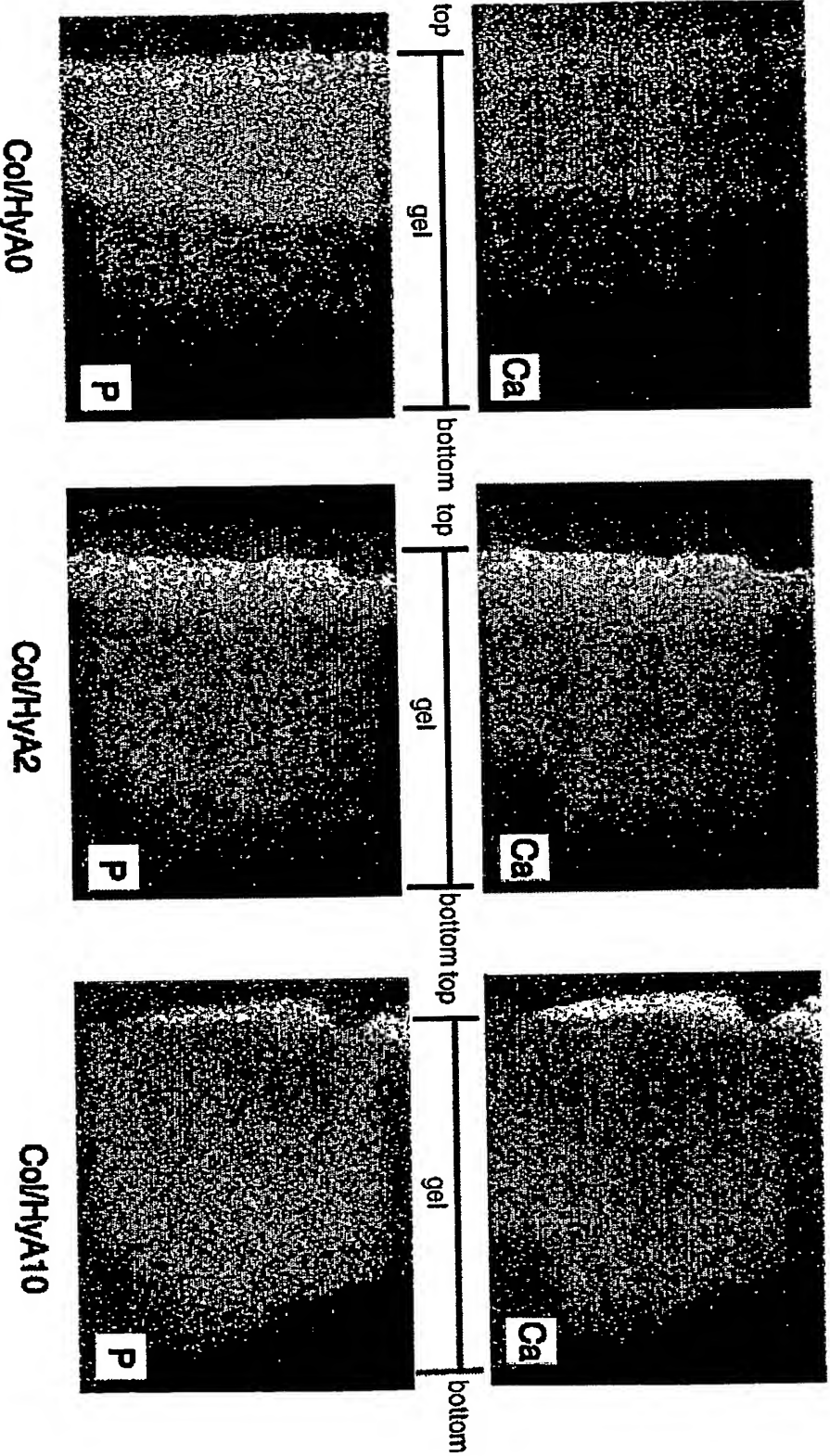
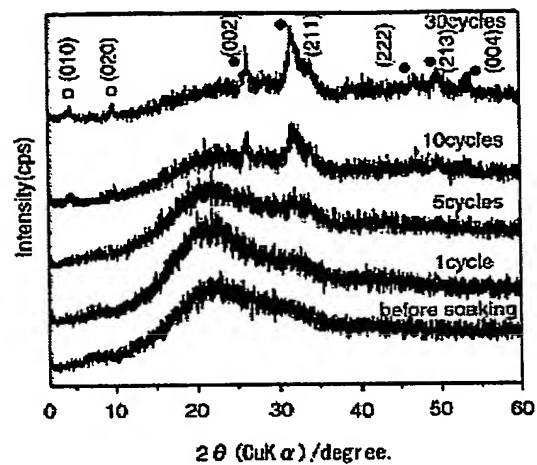
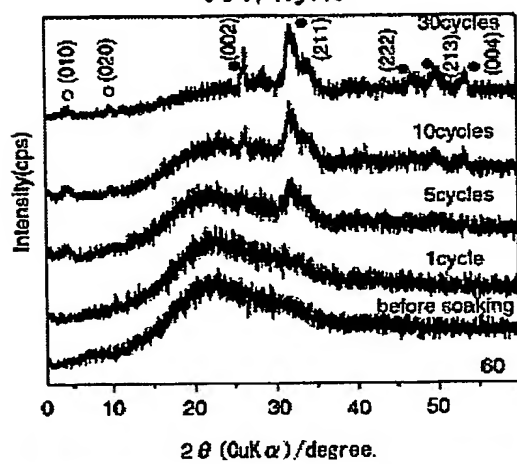


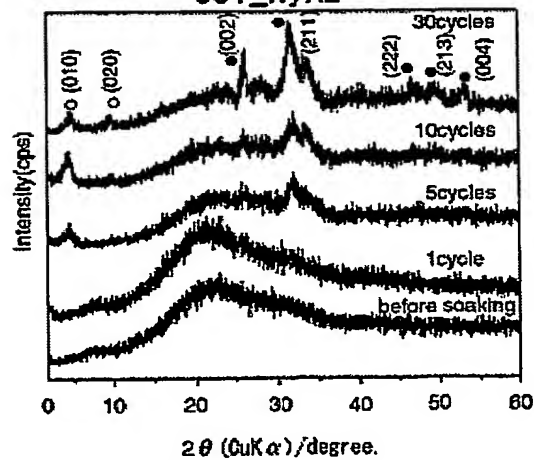
図 4



CoI/HyA0



CoI_HyA2



CoI_HyA10

● HAp
○ OCP

図 5

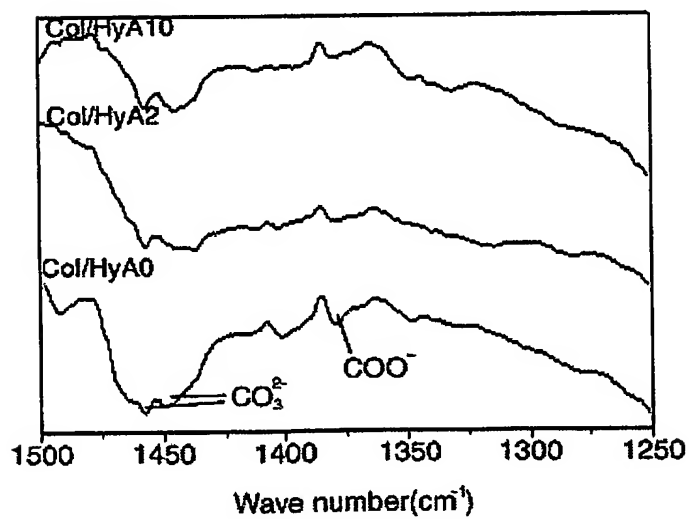
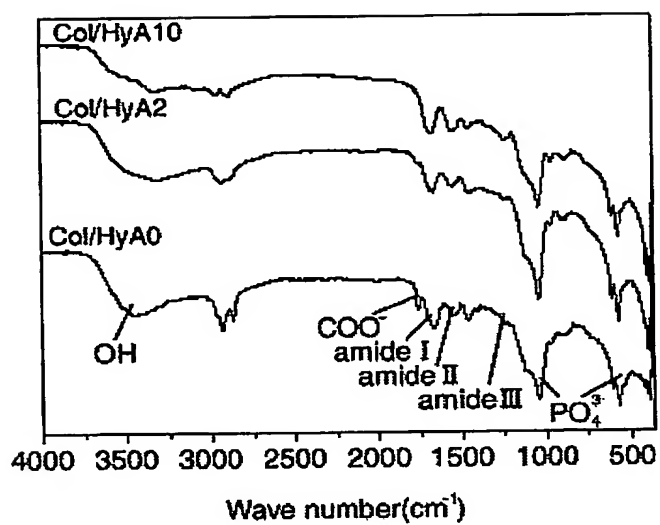


図 6

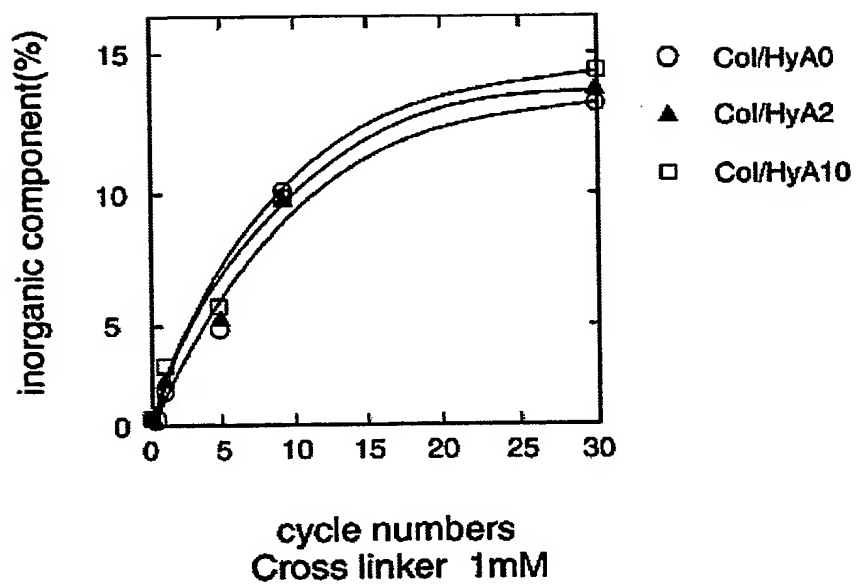
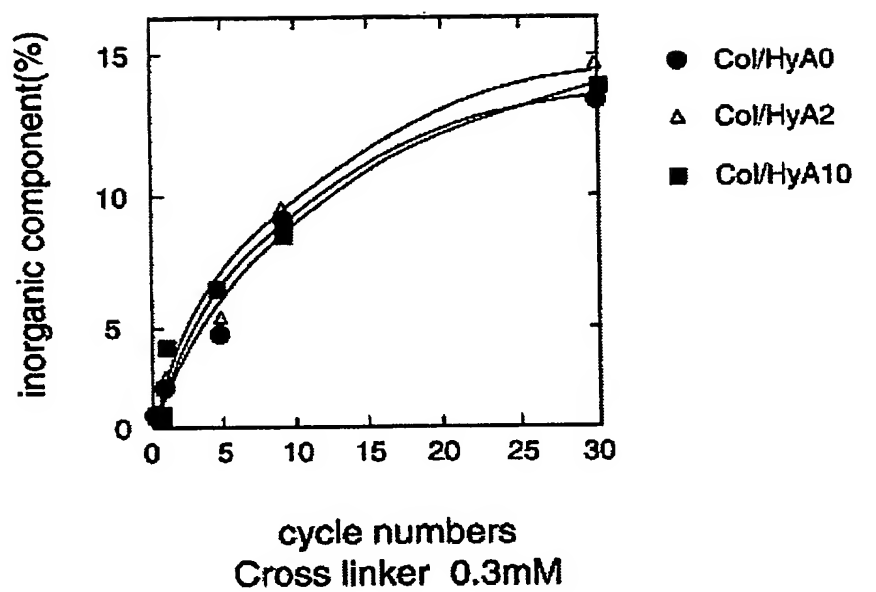
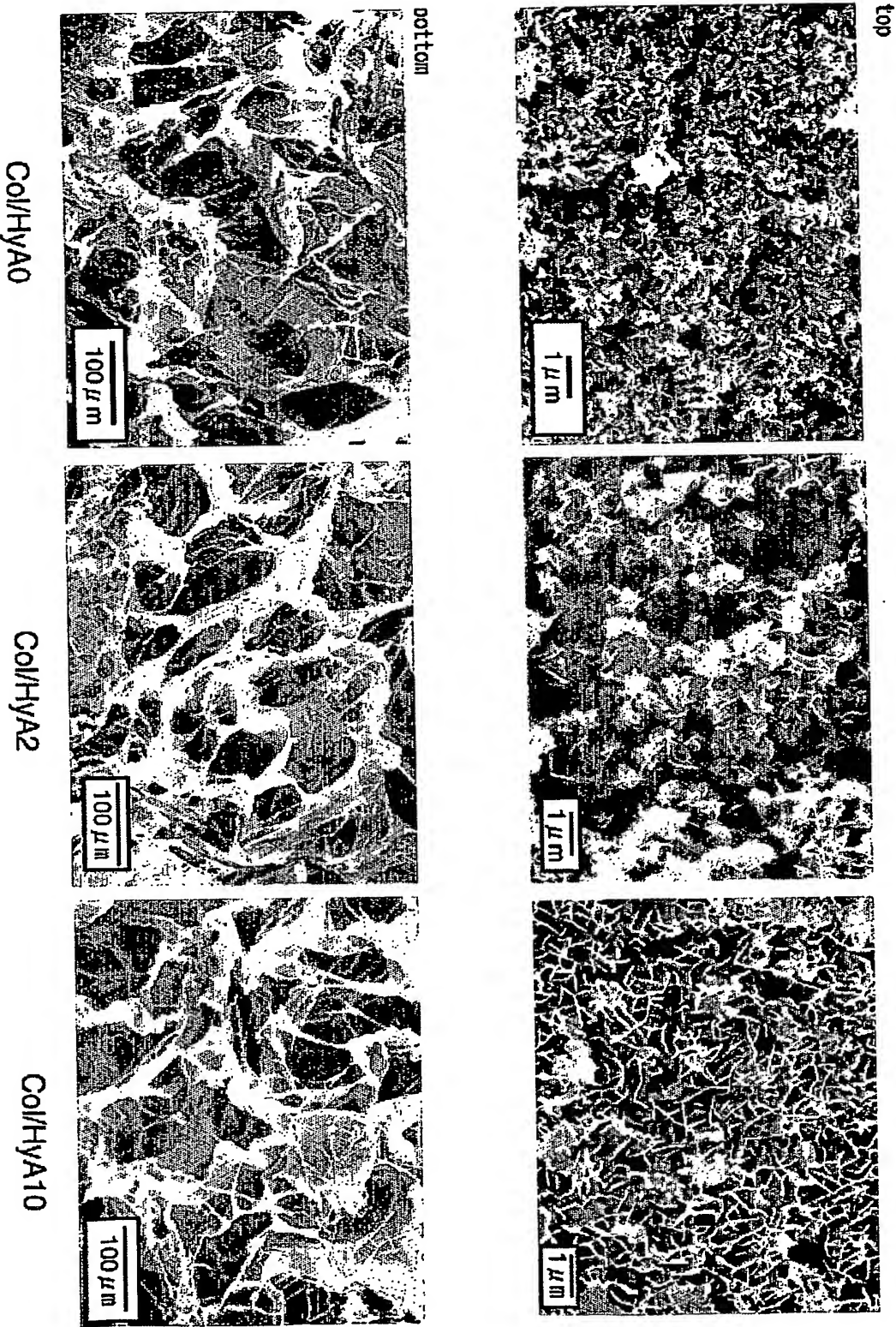


図 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/05611

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61L27/46, 27/54

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61L15/00-33/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/MEDLINE/CIOSIS/EMBASE (STN), WPI/L (QUESTEL),
JSTPlus/JMEDPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 10-052485 A (Takiron Co., Ltd.), 24 February, 1998 (24.02.98), Particularly, Claim 2; Par. Nos. [0016] to [0017] (Family: none)	1, 4-7 2, 3
Y	Junzo TANAKA, Tetsushi TAGUCHI, "Hone, Nankotsu Oyobi Hone-Nankotsu Kaimen o Saisei suru Seitai Zairyo", Journal of Japanese Society for Bioma- terials, 2002, Vol.20, No.2, pages 77 to 84, full text	2, 3
A	WO 01/36012 A1 (Japan as Represented by the Head of National Institute for Research in Inorganic Materials, Science & Technology Agency), 25 May, 2001 (25.05.01), Claim 4 & JP 2001-137329 A & EP 1230938 A1	8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 May, 2003 (29.05.03)

Date of mailing of the international search report
10 June, 2003 (10.06.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ A61L27/46, 27/54

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ A61L15/00-33/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1926-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN),
WPI/L (QUESTEL), JSTPlus/JMEDPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 10-052485 A (タキロン株式会社) 1998. 02. 24, 特に請求項2、【0016】～【0017】段落参照 (ファミリーなし)	1, 4-7 2, 3
Y	田中順三、田口哲志、骨、軟骨および骨-軟骨界面を再生する生体 材料、生体材料、2002, Vol. 20, No. 2, p. 77-84, 全文参照	2, 3
A	WO 01/36012 A1 (科学技術庁無機材質研究所長が代表する日本国) 2001. 05. 25, 請求の範囲4等参照 & JP 2001-137329 A & EP 1230938 A1	8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29. 05. 03

国際調査報告の発送日

10.06.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

岡崎 美穂



4C

3039

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.